5AF-O11: กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโบรมีเลนที่ระดับต่างกัน

The protease activity extracted from hepatopancrease of pacific white shrimp fed with different level of bromelain supplemented feed

รุ่งกานต์ กล้าหาญ[1*] และธิดารัตน์ พิบูลย์สวัสดิ์[1]

Rungkan Klahan[1*] and Thidarat Piboonsawat[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมเอนไซม์โบรมิเลนที่สกัดได้จากเปลือกและมงกุฎสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียต่อระดับการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในกุ้งขาว โดยใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะ P12 (น้ำหนักเริ่มต้นคือ 1.24 – 1.38 กรัม/ตัว) ที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่ระดับ 0%, 1%, 2% และ 4% เป็นระยะเวลา 90 วัน นำมาสกัดเอนไซม์โปรติเอสจาก hepatopancreas ผลการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ศึกษาที่ pH 4 – 10 มีค่าแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเอนไซม์เสริมที่ระดับ 4% มีค่าสูงที่สุด 3.15 – 14.67 mU/min/mg protein ในทุก pH ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์ที่ระดับ 2% มีค่าต่ำสุดในทุก pH โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.35 – 7.64 mU/min/mg protein จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่ระดับ 2% สามารถช่วยให้ประสิทธิภาพการย่อยได้ของโปรตีน และอาหารดีกว่ากลุ่มทดลองอื่นและมีปริมาณมากพอที่จะส่งผลให้ร่างกายของกุ้งขาวลดการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งส่งผลต่อการลดการใช้พลังงานในการสร้างเอนไซม์ และสามารถนำพลังงาน และโปรตีนไปใช้ในขบวนการลอกคราบ และการเสริมสุขภาพได้

คำสำคัญ: กุ้งขาว โบรมีเลน โปรติเอส การลอกคราบ ประสิทธิภาพการใช้อาหาร

Abstract

The aims of this study were to investigates the effect of bromelain extracted from peel and crown of pineapple (Pattavia strain) supplementation in feed on protease activity variation in white shrimp. The initial weight of white shrimp at P12 was in the range 1.24 – 1.38 g/shrimp fed with bromelain supplemented feed at 0%, 1%, 2% และ 4% for 90 days. The hepatopancreas from shrimp trials was extracted and assay the activity at pH 4 – 10. The results showed the protease activity of each treatment was significantly different in all pH ($P<0.05$). The control group and shrimp fed with 4% bromelain supplemented feed have the highest level of protease activity were in the range 3.15 – 14.67 mU/min/mg protein in all pH. On the other hand, shrimp fed with 2% bromelain supplemented feed showed the lowest protease activity was in the range 0.35 – 7.64 mU/min/mg protein and inversion with survival rate and molting. The results indicated that bromelain supplemented at 2% have enough effected on decrease the protease secretion in shrimp that impact on reduced energy consumption on enzyme production bring about to utilize the energy and protein in molting mechanism and health.

Keywords: white shrimp, bromelain, protease, molting, feed utilization

---

[1] สาขาวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

[1] Division of Aquaculture, Faculty of Agricultural Technology, Phetchaburi Rajabhat University

* Corresponding author. E-mail: supremrukiirun@gmail.com

บทนำ

การเลี้ยงกุ้งขาว อาหารถือว่าเป็นต้นทุนหลักที่จะสามารถบ่งบอกรายได้ และกำไรในการเลี้ยงในรอบนั้นๆ และสุขภาพของสัตว์น้ำก็เป็นปัจจัยบ่งชี้ถึงอัตรารอดและปริมาณของสัตว์น้ำที่จะจับได้ในรอบนั้นเช่นกัน ต้นทุนอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำอยู่ที่ 50 – 70% (Halver and Hardy, 2002) ของต้นทุนทั้งหมด นอกจากอาหารจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตแล้ว ยังส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำนั้นด้วย ดังนั้นการใช้อาหารได้มีประสิทธิภาพ หรือการใช้อาหารที่มีราคาถูกจะสามารถลดต้นทุนได้ ซึ่งสวนทางกับราคาอาหารในปัจจุบันที่มีราคาสูง เนื่องจากต้นทุนจากวัตถุดิบแหล่งโปรตีนได้แก่ปลาป่นที่มีราคาแพง กุ้งเป็นสัตว์กินเนื้อที่ต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูง ดังนั้นหากสามารถทำให้กุ้งใช้ประโยชน์จากอาหารได้เต็มประสิทธิภาพ จะทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดี และใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เหมาะสมกับราคาอาหารที่มีราคาสูง และของเสียจากอาหารเหลือ หรือเศษอาหาร หรือของเสียจากการขับถ่ายของกุ้งที่น้อยลง จะส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำ และพื้นบ่อเลี้ยงกุ้ง ส่งผลต่อการดลต้นทุนในการบำบัดน้ำ และพื้นบ่อระหว่างเลี้ยง ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการเลี้ยงทั้งหมดอีกด้วย การนำสับปะรดมาใช้ แก้ปัญหาเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ เนื่องจากสับปะรดมีสารออกฤทธิ์ที่เรียกว่า “โบรมีเลน” เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งจะช่วยให้การย่อยโปรตีนในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำดีขึ้น ส่งผลต่อการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ในร่างกายดีขึ้น (Bhattacharyya, 2008) เนื่องจากการย่อยอาหารขึ้นอยู่กับการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร โดยเฉพาะโปรติเอสที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากอาหารกุ้งขาวมีโปรตีนสูง จึงต้องใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยในปริมาณที่สูงด้วย นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคืออุณหภูมิ และ pH (Eed, 2013) ดังนั้นหากทราบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสในตัวกุ้งหลังจากได้รับอาหารที่เสริมเอนไซม์โบรมีเลน และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว จะทำให้ทราบถึงระดับการเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในตัวกุ้ง เพื่อจะทำให้กุ้งได้รับประโยชน์จากโปรตีนในอาหารได้สูงสุด และลดพลังงานในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในร่างกาย และนำไปใช้ในการเจริญเติบโต หรือในขบวนการเมตตาบอลิซึมต่างๆในร่างกายได้ดีขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โปรติเอสในระบบทางเดินอาหารชองกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโบรมิเลนที่ระดับต่างกัน ในสภาวะอุณหภูมิ และ pH ที่ต่างกัน

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้กุ้งขาวขนาด 14 – 15 กรัม/ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหารจมน้ำ 40% โปรตีน เสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้จากเปลือก และมงกุฎของสับปะรดสายพันธุ์ปัตาเวียระยะดิบที่ระดับ 0, 1, 2 และ 4% เป็นระยะเวลา 90 วัน มาเก็บตัวอย่าง hepatopancrease เพื่อนำไปใช้ในการสกัด และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ serine protease ต่อไป

การสกัดเอนไซม์

นำกุ้งขาวจำนวน 15 ตัวในแต่ละกลุ่มทดลอง แบ่งเป็นกลุ่มทดลองละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ตัว มาทำให้สลบด้วยการแช่เย็นในน้ำผสมน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 $^{\circ}$C มาทำการผ่าส่วนหัวเพื่อเก็บ hepatopancrease มาสกัดเอนไซม์ โดยการเก็บตัวอย่าง hepatopancrease ของกุ้งขาวไปชั่งน้ำหนัก แล้วนำมาบดด้วยโกร่งบดยา ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 mM pH7.5 ที่อัตราส่วน 1:1 (w/v) จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 15,000 g. อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C นาน 20 นาที จากนั้น เก็บส่วนที่เป็นของเหลวด้านบน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ –20°C ตามวิธีของ Gimenez et al. (1999) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ serine protease ต่อไป

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตรเติมสารลาย Azocazien 1% ในบัฟเฟอร์ที่ pH 4 - 10 อุณหภูมิที่ 25 °C และ 30 °C ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 °Cและ 30 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 20% ปริมาตร 1 ml จากนั้นนำตัวอย่างไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิที่ 15,000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที นำตัวอย่างส่วนใสด้านบนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1ml) ใส่ในทดลองและเติมด้วยโซเดียมไฮดอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ml) นำตัวอย่างที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 440 นาโนเมตร (nm) ตามวิธีของ Bezerra et al. (2005) นำข้อมูลกิจกรรมของเอนไซม์ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลแบบ (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's New Multiple Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษา

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์serine protease ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้จากเปลือก และมงกุฎของสับปะรดสายพันธุ์ปัตตาเวียในระยะดิบ ที่ระดับ 0, 1, 2 และ 4% เป็นระยะเวลา 90 วัน ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C และ pH 4 – 10 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ serine protease มีค่าแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง ($P<0.05$) โดยมีค่าต่ำในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่ระดับ 2% ในทุก pH ทั้ง อุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.35 – 10.28 mU/min/mg protein ดังแสดงใน Figure 1 และ Figure 2 และ เมื่อพิจารณาถึงการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Table 1

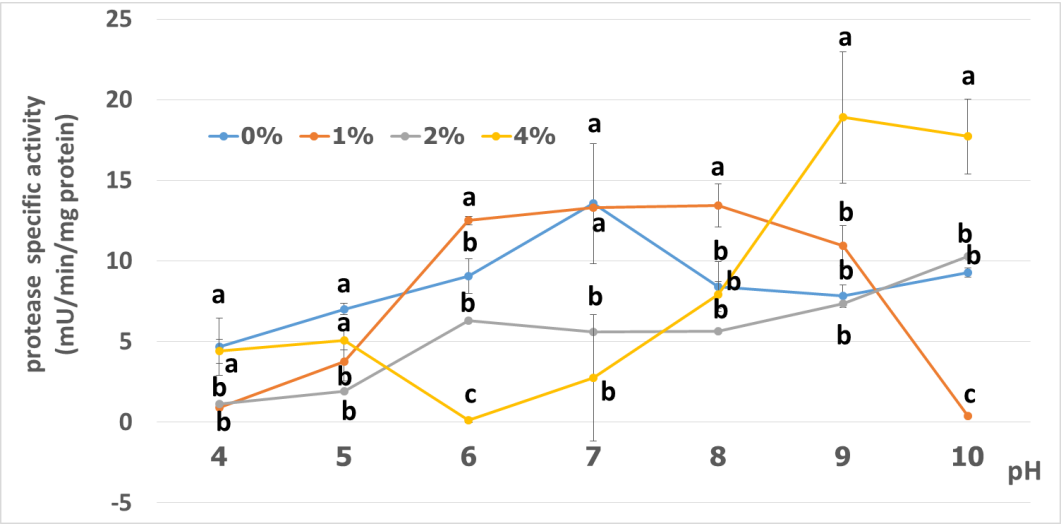

Figure 1 Serine protease activity (mU/min/mg protein) extracted from the hepatopancreas of shrimp fed with bromelain crude extracted supplemented at 25 °C with different pH

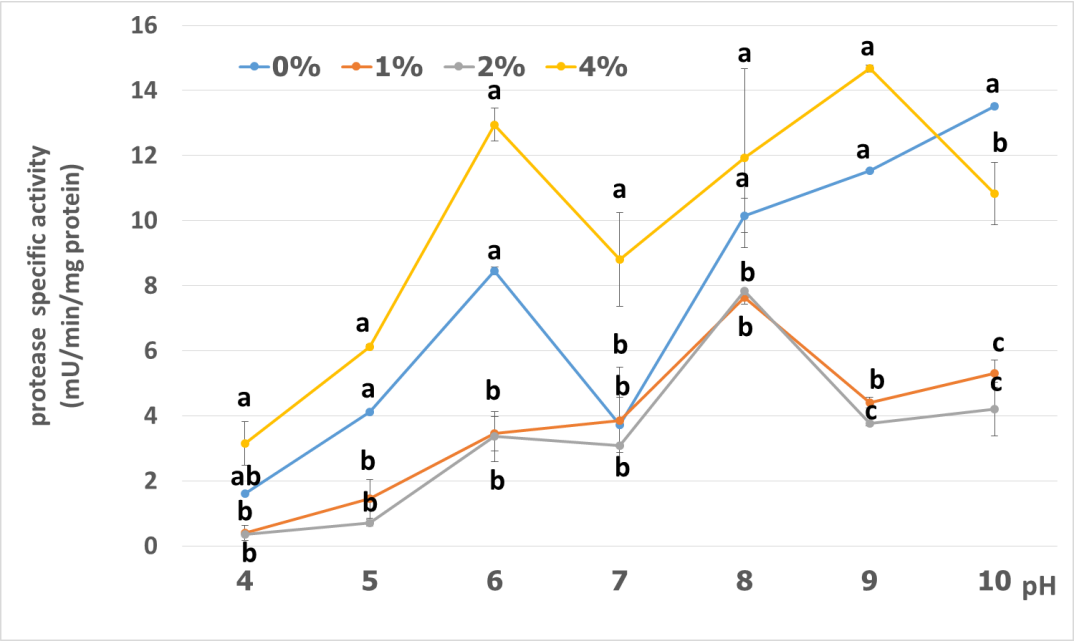

Figure 2 Serine protease activity (mU/min/mg protein) extracted from the hepatopancreas of shrimp fed with bromelain crude extracted supplemented at 30 °C with different pH

สำหรับการเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากทางเดินอาหารของกุ้งขาวที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C โดยข้อมูลที่นำมาแสดงได้จากการนำค่ากิจกรรมของเอนไอนไซม์ในทุก pH ของแต่ละอุณหภูมิมารวมกัน แสดงใน Table 1 ซึ่งพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่สกัดได้จากมงกุฎ และเปลือกสับปะรดที่ระดับ 2 และ 4 % มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่อุณหภูมิ 25 °C (P<0.05) แต่การเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่ระดับ 0 และ 1% มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

Table 2 The comparision of serine protease activity (mU/min/mg protein) extracted from the hepatopancreas of shrimp fed with bromelain crude extracted supplemented at 25 and 30 °C

Temperature (°C)	Bromelain supplementation level (%)			
	0	1	2	4
25	36.78 ± 1.95[a]	27.80 ± 0.31[a]	42.33 ± 3.65[a]	56.89 ± 1.52[a]
30	38.02 ± 1.16[a]	23.20 ± 2.55[a]	18.68 ± 1.88[b]	43.60 ± 0.00[b]
P - value	0.5214	0.1276	0.0148	0.0065

Note : a,b Means within a column with common superscript are significantly different (P<0.05).

อภิปรายผล

กิจกรรมของเอนไซม์ serine protease มีค่าแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลอง (P<0.05) โดยมีค่าต่ำในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนที่ระดับ 2% ในทุก pH ทั้ง อุณหภูมิ 25 และ 30 °C โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.35 – 10.28 mU/min ซึ่งสอดคล้องในเชิงผกผันกับค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีน การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ รวมถึงอัตราการลอกคราบ และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวในกลุ่มทดลองนี้ที่มีค่าดีกว่ากลุ่มทดลองอื่นในการทดลองก่อนหน้านี้ ทั้งนี้เนื่องจากการได้รับการเสริมเอนไซม์โบรมิเลนจะทำให้การย่อยสายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนในอาหารถูกทำลาย หรือถูกย่อยได้มากขึ้น ซึ่งเป็นคุณสมบัติขิงเอนไซม์โบรมิเลนทำให้เหลือสายเปปไทด์ของโปรตีนในอาหารน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อปริมาณของสายเปปไทด์ลดลง การผลิตเอนไซม์จากร่างกายของกุ้งขาวจะลดลงตามปริมาณของโปรตีนที่ถูกย่อยที่ลดลงด้วย เนื่องด้วยคุณสมบัติของการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำที่จะเปลี่ยนแปลงตามปริมาณสารอาหารที่ได้รับ ถึงแม้ระดับโปรตีนจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่สายพันธะที่ถูกตัดทำให้การย่อยอาหารมีประสิทธิภาพดีขึ้น และเร็วขึ้น การที่สัตว์น้ำได้รับสารอาหารที่มีการย่อยได้ง่าย และเร็ว จะส่งผลให้ระดับของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งวิเคราะห์จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลง และน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Figueiredo et al. (2019) ที่พบกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนมีค่าแปรผันกับพฤติกรรมการกินอาหาร และพื้นที่ที่อยู่อาศัย ซึ่งพื้นที่ที่มีความสมบูรณ์ของอาหารต่างกัน สภาพแวดล้อมในฤดูกาลหรือสถานที่ที่ต่างกัน ก็จะมีส่งผลต่อการผันแปรของกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารได้เช่นกัน นอกจากนี้ผลที่ได้ยังคล้ายกับการศึกษาของ Luna-González et al. (2017) ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยเฉพาะเอนไซม์กลุ่มserine protease ได้แก่ trypsin และ chymotrypsin จะมีค่าลดลง เมื่อกุ้งได้รับอาหารลดลงจากปกติ 100 % เหลือเพียง 80 – 90% ของอาหารที่เคยได้รับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการที่กุ้งได้รับอาหารในปริมาณลดลง หรือได้รับอาหารที่ถูกย่อยได้ง่ายขึ้นจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ในร่างกายลดลงด้วย ซึ่งจากพลังงานที่ถูกนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลงและการทำงานของร่างกายในการย่อยโปรตีนลดลง กุ้งจึงมีพลังงาน และสารอาหารไปใช้ในการลอกคราบและการเจริญเติบโตได้ดีกว่า ถึงแม้ว่าการเจริญเติบโตของกุ้งขาวจะไม่เพิ่มขึ้นอย่างแตกต่างทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่ดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น ซึ่งพบผลดังกล่าวในการทดลองก่อนหน้านี้ ซึ่งผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Nery et al. (2019) ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งขาวมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับน้ำหนักของกุ้งขาวโดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารเพียง 3 มื้อต่อวันแต่เลี้ยงในระบบ biofloc system มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าต่ำกว่าการทดลองอื่น เมื่อพิจารณาถึงอุณหภูมิ และ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้มีค่าการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ซึ่งการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม serine protease ทำงานได้ดีในสภาวะด่างที่ pH 6 – 9 เพื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากทางเดินอาหารของกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมเอนไซม์โบรมีเลนมีค่าสูงที่อุณหภูมิ 25 °C ทั้งนี้เนื่องจาก กุ้งขาวเป็นสัตว์เลือดเย็น อุณหภูมิในร่างกายจะแปรผันตามอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม นั่นก็คือน้ำที่ใช้ในการเลี้ยง ซึ่งในขณะเลี้ยงกุ้ง อุณหภูมิน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งอยู่ที่ 26 °C ดังนั้นจึงส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์มีค่าสูงที่ระดับอุณหภูมิดังกล่าว (Eed, 2013; Lemos et al., 2000; Ribeiro & Jones, 2000)

สรุป

การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหารกุ้งขาวมีการตอบสนองดีที่สุดต่อการสริมเอนไซม์โบรมิเลนที่ระดับ 2% ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 4 – 10 เนื่องจากมีการผลิตเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่มทดลองอื่น ส่งผลต่อการลดการใช้พลังงานในการสร้างเอนไซม์ และสามารถนำพลังงาน และโปรตีนไปใช้ในขบวนการลอกคราบ และการเสริมสุขภาพ

เอกสารอ้างอิง

Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Luana, C.B.B. & Jr, L.B. (2005). Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Proc. Biochem*. 40: 1829 – 1834.

Bhattacharyya. B.K. 2008. Bromelain : An overview. Natural production radiance. 7: 359 – 363.

Eed, J. (2013). Factors Affecting Enzyme Activity. *ESSAI*. 10(19): 4-12.

Figueiredo, M. S. R. B. & Anderson, A. J. (2019). Digestive enzyme spectra in crustacean decapods (Paleomonidae, Portunidae and Penaeidae) feeding in the natural habitat. *Aquaculture Nutrition*, 40(3): 282 - 291.

Gimenez, A.V.F., Fernandez, I., Preciado, R.M., Oliva, M., Tova, D.,& Nolasco H. (1999). The activity of digestive enzyme during the molting stage of the arched swimming Callinectes *Arcautus orday*, 1863. (Crustacea : decapoda: portunidae). *Bull. Mar. Sci*. 65(1): 1 – 9.

Halver, J.E. and R. W. Hardy. 2002. *Fish Nutrition*. 3rd Ed., Academic Press, New York.

Lemos, D., Ezquerra, J. M., & García-Carreño, F. L. (2000). Protein digestion in penaeid shrimp: Digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. *Aquaculture*, 186, 89–105.

Luna-González, A., Ávila-Leal, J., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., Esparza-Leal, H., Escamilla-Montes R., Flores-Miranda, M. del C., Montiel-Montoya, J. & López-Álvarez, E. S. (2017). Effects of bacilli, molasses, and reducing feeding rate on biofloc formation, growth, and gene expression in *Litopenaeus vannamei* cultured with zero water exchange. *Lat. Am. J. Aquat. Res*., 45(5): 900-907.

Nery, R. C., Costa, C. B., Rodrigues, F., Soares, R., Bezerra, R. de S. & Peixoto, S. (2019). Effect of feeding frequency on growth and digestive enzyme activity in *Litopenaeus vannamei* during the grow-out phase in biofloc system. *Aquaculture Nutrition*, 25: 577–584.

Ribeiro, F. A. L. T., & Jones, D. A. (2000). Growth and ontogenetic change in activities of digestive enzymes in Fennero *Penaeus indicus* postlarvae. *Aquaculture Nutrition*, 6, 53–64.